

Title	Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus Replication through Interaction with NS5A and NS5B
Author(s)	浜本, いつき
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46136
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について /a> をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 ^{はま} 濱 ^{もと} 本 ^い づ ^き き

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 20114 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

医学系研究科分子病態医学専攻

学 位 論 文 名 Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus Replication through Interaction with NS5A and NS5B
(ヒト VAP-B は NS5A 及び NS5B との相互作用を介して HCV 複製に関与する)

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 松浦 善治

(副査)
教 授 生田 和良 教 授 松田 道行

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

C 型肝炎ウイルス (HCV) に感染すると肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。我が国には2百万人もの HCV 感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。最近、限定された細胞でのみ複製できる特殊な HCV クローンが構築されたが、実際に臨床で問題となっているインターフェロンに耐性を示す遺伝子型の HCV を効率よく複製できる細胞培養系は依然として確立できていないのが現状である。したがって、HCV の感染、複製、そして肝疾患の発生病理機序は依然として謎に包まれたままである。本研究では HCV の複製や病原性発現に重要な役割を演じている NS5A 蛋白質の機能を明らかにするために、NS5A 蛋白質と相互作用する宿主因子を解析した。これまでに、Human vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) のサブタイプ A (VAP-A) が NS5A と NS5B に結合し、HCV の複製に重要であることが報告されていた。今回新たに、VAP-A のホモログである VAP-B も NS5A と相互作用することを明らかにし、HCV 複製での役割について検討した。

【方法ならびに成績】

1. NS5A と相互作用する宿主因子の検索

ヒト脳及びヒト肝臓の cDNA ライブラリーを用いて HCV の Con1 株 (遺伝子型 1b) の NS5A と相互作用する宿主因子を Yeast two hybrid 法でスクリーニングし、VAP-B を同定した。

2. VAP-B のダイマー形成

HEK293T 細胞に VAP-A、VAP-B および、これらの膜貫通領域 (TMD) を欠損させた変異体を発現させ、免疫沈降法でダイマー形成を検討した。VAP-B はホモダイマーを形成したが、TMD を欠損させると結合は観察されなかった。また、VAP-B と VAP-A のヘテロダイマー形成も TMD の欠損により消失したことから、VAP は TMD を介してホモおよびヘテロダイマーを形成していることが示された。

3. VAP-B と NS5B との結合

これまでに VAP-A は NS5A だけでなく RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである NS5B にも結合することが報告さ

れている。そこで、VAP-B の NS5B への結合活性を免疫沈降法で検討した。遺伝子型 1a および 1b 由来の NS5B は VAP-A だけでなく VAP-B と共沈した。

4. VAP-B と NS5A の細胞内局在

HeLa 細胞に NS5A と VAP-B を発現させて両蛋白質の細胞内局在を免疫染色法で観察した。その結果、NS5A と VAP-B はともに小胞体とゴルジ体マーカーと共局在したことから、両蛋白質は小胞体とゴルジ体で共局在することが示された。

5. VAP-B と NS5A の結合様式

NS5A の各種欠損変異体を作製して VAP-B との結合領域を免疫沈降法で解析した。その結果、NS5A の N 末端側 66 から 70 番目の 5 アミノ酸と C 末端側 341 から 344 番目までの 5 アミノ酸が VAP-B との結合に重要であった。また、VAP-B の coiled-coil 領域を欠損させると NS5A との結合が消失することから、VAP-B は coiled-coil 領域を介して NS5A に結合しているものと考えられた。

6. VAP-B の HCV RNA 複製への関与

ニワトリ抗 VAP-B 抗体を作製し、HCV RNA の無細胞複製系を用いて VAP-B の複製への関与を検討した。HCV RNA の無細胞複製系に抗 VAP-B 抗体を添加することによってウイルス RNA の複製が阻害された。HCV のレプリコン細胞に VAP-B を過剰発現させると NS5A と NS5B の増加が観察されたが、TMD を欠損させた VAP-B では発現に影響は認められなかった。また、siRNA で内在性の VAP-B をノックダウンさせると、NS5B の発現および HCV RNA の複製が抑制された。

【総括】

VAP-B は NS5B と NS5A に相互作用するとともに、その TMD を介してホモダイマーや VAP-A とヘテロダイマーを形成し、HCV ゲノムの複製複合体の安定性を図ることによって、HCV ゲノムの複製に重要な役割を演じていることが明らかとなった。これまでの抗ウイルス剤の開発は、ウイルスに特異的な酵素をターゲットとしているため、ウイルスの変異による耐性ウイルスの出現が大きな問題となっていた。特に変異の激しい HCV の様な RNA ウイルス感染症の征圧には、変異の心配の少ない複製に必須な宿主因子を標的とした抗ウイルス薬の開発が重要であり、VAP も有望な候補のひとつであると思われる。

論文審査の結果の要旨

C 型肝炎ウイルス (HCV) に感染すると高率に慢性化し、肝硬変や肝細胞癌を引き起こす。しかしながら、HCV の感染、複製、そして肝疾患の発生病理機序は未だ明らかにされていない。本論文では、HCV の複製や病原性発現に重要な役割を演じている NS5A 蛋白質の機能を明らかにするため、NS5A と相互作用する宿主因子を解析した。これまでに Human vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) のサブタイプ A (VAP-A) が NS5A と NS5B に結合し、HCV の複製に重要であることが報告されていた。

今回、新たに、VAP-A のホモログである VAP-B を同定し、HCV 複製における役割を検討した。VAP-B は NS5B と NS5A に相互作用するとともに、その膜貫通領域を介してホモダイマーおよび VAP-A とヘテロダイマーを形成することが示された。さらに、VAP-B の発現抑制や特異抗体によって HCV RNA の複製が低下したことから、VAP-B は HCV ゲノムの複製複合体の安定性を図り、HCV の複製に重要な役割を演じている宿主因子であることが明らかとなった。

本論文は、HCV の複製機構に関与する新規宿主因子を同定したものであり、学位の授与に値すると思われる。